

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro

525238

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
1. April 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/027428 A1(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/569

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009354

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. August 2003 (22.08.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
02090300.1 23. August 2002 (23.08.2002) EP(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): DEUTSCHES RHEUMA-FORSCHUNGS ZEN-  
TRUM BERLIN [DE/DE]; Schumannstr. 21/22, 10117  
Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FRENTSCH, Marco  
[DE/DE]; Kurfürstenstr. 4A, 10785 Berlin (DE). ROTHE,  
Martin [DE/DE]; Plauerstr. 28, 13055 Berlin (DE).  
THIEL, Andreas [DE/DE]; Urbanstr. 171b, 10961 Berlin  
(DE).(74) Anwälte: RASCH, Dorit usw.; Gulde Hengelhaupt Ziebig  
& Schneider, Schützenstrasse 15-17, 10117 Berlin (DE).(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETECTING AND ISOLATING T LYMPHOCYTES THAT RECOGNIZE A DEFINED ANTIGEN

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS UND ZUR ISOLIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN, DIE EIN DEFINIER-  
TES ANTIGEN ERKENNEN(57) Abstract: The invention relates to the utilization of CD154 for detecting and/or isolating antigen-specific T lymphocytes and  
to a method for detecting and/or isolating antigen-specific T lymphocytes, wherein the suspension is brought into contact with a  
CD40/CD154 system inhibitor, CD154 is determined intra or extracellularly and the cells having CD154 are detected and/or isolated.(57) Zusammenfassung: Es wird die Verwendung von CD154 zum Nachweis und/oder zur Isolierung von Antigen-spezifischen  
T-Lymphozyten und ein Verfahren zum Nachweis und/oder Isolierung von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten vorgeschlagen,  
wobei die Suspension mit einem CD40/CD154 Systeminhibitor in Kontakt gebracht wird, CD154 intra- oder extrazellulär bestimmt  
und die CD154 aufweisenden Zellen nachgewiesen und/oder isoliert werden.

WO 2004/027428 A1

---

**Verfahren zum Nachweis und zur Isolierung von T-Lymphozyten, die ein definiertes Antigen erkennen**

---

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von CD154 zum Nachweis und zur Isolierung von T-Lymphozyten, die ein definiertes Antigen erkennen, und ein Verfahren zum Nachweis und zur Isolierung von T-Lymphozyten in Zellsuspensionen oder Körperflüssigkeiten, die ein definiertes Antigen erkennen.

Das Immunsystem besteht aus Zellen und Molekülen, die im Körper zirkulieren und deren Homeostase und Kooperation durch Zytokine und Wachstumsfaktoren aufeinander abgestimmt werden. Nicht benötigte Zellen werden durch Apoptose eliminiert. Diese Mechanismen werden durch äußere Einflüsse oder genetische Prädispositionen verschiedenster Art beeinflusst. Das Immunsystem spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung vieler Erkrankungen, insbesondere Allergien, Entzündungen und Autoimmunerkrankungen. Es ist verantwortlich für eine verstärkte Immunität nach Impfungen, versagt jedoch bei der Entstehung von Tumorerkrankungen.

Dendritische Zellen (DC) sind die Wächter des Immunsystems und im Körper dort lokalisiert, wo fremde und möglicherweise gefährliche Stoffe eindringen können. Sie sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen, die das Antigen aufnehmen, verdauen, Peptidfragmente des Antigens spezifischen T-Lymphozyten präsentieren und sie dabei

aktivieren. Die unreifen Vorläufer der DC wandern kontinuierlich über das Blut in die Lymphorgane, wo sie unter bestimmten Umständen zu reifen DC differenzieren können. Es gibt verschiedene Vorläuferzellen, die zu unterschiedlichen Typen von DC ausreifen können. Diese unterschiedlichen Typen von DC reagieren auch unterschiedlich auf Antigene durch die Expression bestimmter Membranmoleküle und Zytokine. Auf diese Weise kontrollieren sie die Aktivierung der T-Lymphozyten, die dann pro- (Th1) oder antiinflammatorisch (Th2), regulatorisch (Tr) oder tolerant (Ta) werden können. Die Art der Aktivierung der T-Lymphozyten wird durch kostimulatorische Aktivierungssignale von Antigen-präsentierenden Zellen bestimmt. Aktivierungssignale sind Liganden für Rezeptoren der T-Lymphozyten. Diese Liganden befinden sich auf der Oberfläche der APC, sie sind an die extrazelluläre Matrix gebunden oder sie werden von Zellen sezerniert, so die Zytokine. Neben der Antigen-spezifischen Aktivierung durch Signale über den Antigenrezeptor der T-Lymphozyten und kostimulierende Liganden ist jedoch auch eine unspezifische Aktivierung von T-Lymphozyten beschrieben; z. B. durch Zytokine oder durch Lektine.

Die Gesamtheit der molekularen Veränderungen bei der Aktivierungsreaktion und funktionellen Differenzierung von T-Lymphozyten ist jedoch derzeit nur unvollständig aufgeklärt. So ist auch die Erfassung des Aktivierungs- und Funktionszustandes von T-Lymphozyten, die ein bestimmtes Antigen erkennen, beim gegenwärtigen Stand der Technik nur ungenau möglich.

Für klinische Anwendungen bei der Diagnostik von Krankheiten und in der Forschung ist es essentiell, insbesondere solche spezifischen T-Lymphozyten erfassen zu können, die durch ein bestimmtes Antigen aktiviert werden können oder aktivierbar sind. Weiterhin ist es wünschenswert, solche Antigen-spezifischen T-Lymphozyten aus Zellgemischen insbesondere für zelltherapeutische Zwecke isolieren zu können.

Im Stand der Technik sind mehrere Verfahren offenbart, mit denen der Aktivierungs- und Funktionszustand von T-Lymphozyten bestimmt werden kann. So offenbart die DE 100 21 834 A1 mRNA-Moleküle zur Verwendung als Indikatoren für den Funktionszustand von T-Lymphozyten, wobei die mRNA-Moleküle bei aktivierten T-Lymphozyten im Vergleich zum Normal- bzw. zum Ruhezustand vermehrt oder vermindert exprimiert sind. Durch Bestimmung der Interaktion zwischen den komplementären, hybridisierten Nucleinsäuresequenzen ist es möglich, Unterschiede in der Expressionsstärke der mRNA-Moleküle zu bestimmen, was Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand der T-Lymphozyten zulässt. Weiterhin offenbart diese Druckschrift die Verwendung von Polypeptiden, die durch die Nucleotidsequenzen codiert werden und gegen die Polypeptide gerichtete Antikörper sowie die Verwendung dieser Antikörper zum Nachweis des Aktivierungs- und Funktionszustandes von T-Lymphozyten.

Die DE 37 37 703 A1 offenbart Antikörper, die gegen ein neutrophil aktivierendes Polypeptid gerichtet sind und als Diagnostikum eingesetzt werden können, um aktivierte

Strukturen der zellulären Immunantwort zu detektieren und zu charakterisieren.

Die DE 42 26 974 C2 offenbart ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Aufbereitung und Separation von Zellsuspensionen. Die beschriebene Separationsvorrichtung und das Verfahren zur kontinuierlichen Aufbereitung einer Zellsuspension kann verwendet werden, um unterschiedliche Bestandteile, beispielsweise des menschlichen Blutes zu separieren, wobei Zellen, die im Zusammenhang mit der zellulären Immunantwort stehen, spezifisch aufgereinigt werden können.

In der US-PS 5,874,302 wird ein Verfahren offenbart, mit dem T-Lymphozyten kultiviert werden und die so gewonnenen T-Lymphozyten zu klinischen Behandlungen von Tumoren eingesetzt werden. Gemäß der US-PS 5,874,302 wird Blut als Ausgangsmaterial für die Herstellung der T-Zellkultur-Suspension verwendet, wobei das entsprechende Startmaterial mit bestimmten Tumorzellen kokultiviert wird.

Die CA 1,296,622 offenbart ein Verfahren und eine Vorrichtung zum Bestimmen des immunregulatorischen Status von Leukozyten. Die Leukozyten werden mit Standardsubstanzen stimuliert, um den immunregulatorischen Status, beispielsweise mit Hilfe von markierten Antikörpern zu bestimmen. Zunächst wird hierzu eine Probe aus peripheren mononukleären Zellen des Patienten, der ein Immun-beeinflussendes Mittel erhalten hat, vermehrt und anschließend wird in einem Aliquot der vermehrten Probe der Prozentsatz von mononukleären Zellen bestimmt, welche ein Aktivierungs-Antigen in vitro exprimieren. Anschließend wird der Prozentsatz mit einem vorgegebenen Wert des

Prozentsatzes als Anzeige des in vitro Effektes verglichen, wodurch der immunregulatorische Zustand des Patienten bzw. des Effektes der Immun-beeinflussenden Therapie auf den immunregulatorischen Zustand bestimmt werden kann. Zu den  
5 Unterklassen der zu bestimmenden mononukleären Zellen gehören beispielsweise T-Lymphozyten, cytotoxische T-Lymphozyten und Helfer-T-Lymphozyten.

In der WO 99/58977 wird ein Verfahren zur direkten Selektion von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten  
10 beschrieben. Die T-Lymphozyten werden hier anhand der Produktion von Zytokinen mittels Durchfluss-Zytometrie oder der magnetischen Zellsortierung separiert. Es werden hier solche aktivierte T-Lymphozyten selektiert, die nach Stimulation mit Antigen ein bestimmtes oder mehrere  
15 bestimmte Zytokine exprimieren.

Weiterhin ist es mit den bekannten diagnostischen Verfahren nicht möglich, die Aktivierung durch eine virale oder bakterielle Infektion von einer Aktivierung durch eine Autoimmunreaktion oder durch eine Transplantatabstoßung zu  
20 unterscheiden, obwohl eine solche Unterscheidung aus diagnostischen und aus klinischen Gesichtspunkten heraus wünschenswert ist. Durch die unzureichende Detektion von aktivierten T-Lymphozyten in einer biologischen Probe ist es auch nicht möglich, diese entsprechenden Zellen gezielt  
25 zu separieren, da sie hierfür zunächst eindeutig bestimmt werden müssen.

Bisher sind keine immundiagnostischen Verfahren beschrieben, die einen schnellen und einfachen Nachweis der Gesamtheit aller für ein Antigen spezifischen T-Lymphozyten  
30 und darüber hinaus deren Isolierung ermöglichen. Bei den

verschiedensten Erkrankungen ist es von größtem diagnostischem und therapeutischen Interesse, die die Immunantworten zentral und somit auch verschiedenste Immunpathogenesen steuernden T-Lymphozyten direkt Antigen-spezifisch nachzuweisen oder sie für zelltherapeutische Ansätze, wie den adoptiven T-Zelltransfer, zu isolieren. Dies betrifft Erkrankungen wie Allergien und Autoimmunerkrankungen, denen fehlgesteuerte Immunreaktionen zu Grunde liegen wie auch chronische Infektionskrankheiten, Tumore oder Leukämien.

Bisherigen Verfahren liegen zwei unterschiedliche Strategien zugrunde:

- (i) Der „strukturelle“ Nachweis Antigen-spezifischer T-Lymphozyten basiert auf der direkten Markierung der von den T-Lymphozyten ausgeprägten T-Zellrezeptoren mittels MHC-Multimeren, die zusammen mit den jeweiligen antigenen Peptiden komplexiert sind (US 5,635,363 / FR 9911133). Die Nachteile solcher Verfahren bestehen darin, dass sie zum einen abhängig von dem der zu untersuchenden Individuen ausgeprägten MHC-Genotyp sind und zum anderen dass die MHC-Moleküle nur mit einem immundominanten Peptidepitop des jeweiligen Antigens komplexiert werden. Jedes Agens muss somit individuell entsprechend des Genotyps und zu verwendenden immundominanten Peptidepitops, das zudem nur bei wenigen Antigenen und auch nur für wenige MHC-Allele bekannt ist, des Antigens hergestellt werden. Zudem konnten bisher die für den Nachweis und die Isolierung MHC-II restringierter Antigen-spezifischer CD4+ Th-Lymphozyten essentiellen MHC-II Multimere aufgrund besonderer struktureller Merkmale des

MHC-II Moleküls nicht in für eine Anwendung ausreichender Qualität hergestellt werden.

(ii) Funktionale Nachweise Antigen-spezifischer T-Lymphozyten beruhen entweder auf der Antigen-reaktiven Proliferation nach Stimulation mit Antigen, die jedoch erst nach 3-5 Tagen detektierbar ist, oder auf Antigen-reaktiver Expression von Aktivierungsmolekülen oder Sekretion von Zytokinen. Während bisher beschriebene Aktivierungsmarker zum Teil auch von speziellen nicht aktivierten T-Lymphozyten ausgeprägt werden und daher nicht spezifisch genug sind, kann anhand der „reaktiven“ Expression von Zytokinen nicht die Gesamtheit der spezifischen T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Durch die unzureichende Detektion von spezifisch aktivierten T-Lymphozyten in einer biologischen Probe ist somit auch nicht möglich, diese entsprechenden Zellen gezielt zu separieren, da sie hierfür zunächst eindeutig bestimmt werden müssten.

Die bekannten Verfahren, bei denen spezifische T-Lymphozyten aufgrund ihrer Zytokin Sekretion detektiert und isoliert werden, beispielsweise nach der WO 99/58977, kann die Gesamtheit aller spezifischen T-Lymphozyten nicht bestimmt und isoliert werden, da sich oft jede aktivierte T-Zelle durch individuelle Zytokinprogramme auszeichnet.

Nachteilig bei den bekannten Verfahren der Isolierung von lebenden T-Lymphozyten anhand der Produktion von Zytokinen ist weiterhin, dass die Zellen zum Zeitpunkt ihrer maximalen Sekretionsleistung aus der Kultur herausgenommen werden, um an ihnen eine für die jeweiligen Zytokine spezifische „Fangmatrix“ anzubringen. Danach müssen die Zellen für eine kurze Zeit wieder kultiviert werden. Dies



erhöht den technischen Aufwand zur Gewinnung spezifischer T-Lymphozyten beträchtlich. Gerade in den letzten Jahren wurden in verschiedenen Veröffentlichungen immer wieder regulatorische T-Lymphozyten (Tr/Treg) beschrieben, denen  
5 sich keine definierten Zytokinmuster zuordnen lassen, d.h. die Zellen sind anhand einer Zytokinsekretion nicht detektierbar oder isolierbar. Zudem ist die Expression bestimmter Zytokine (z. B. IL-10) auch entscheidend von der Art der gewählten in vitro Aktivierung abhängig.

10 Der bisherige Nachweis und die Isolierung von spezifischen T-Lymphozyten ist bisher auch deshalb limitiert, da zwar eine Reihe von Biomolekülen bekannt sind, die als Indikatoren bzw. Marker für bestimmte aktivierte T-Lymphozyten herangezogen werden können, jedoch ist es  
15 derzeit aufgrund der begrenzten Zahl und Qualität der verfügbaren Aktivierungsmarker nicht möglich, durch Bestimmung eines dieser Marker zu entscheiden, ob die T-Lymphozyten sich in dem gewünschten Zustand befinden. Beispielsweise wird der Aktivierungsmarker CD69 von allen  
20 T-Lymphozyten nach Aktivierung exprimiert. Jedoch führen auch jegliche Stresseinwirkungen zur Expression von CD69, so dass durch Bestimmung dieses Markers keine Aussage über die Antigen-spezifischen T-Lymphozyten möglich ist.

Im Stand der Technik ist die erhöhte Expression des CD154  
25 auf CD4+ Th-Zellen als einen Marker für Krankheitsaktivität bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) bekannt (Berner et al., 2000). In diesem Zusammenhang wird der Gebrauch von CD154 als spezieller prognostischer bzw. diagnostischer Marker bei einer Gruppe an RA erkrankter  
30 Patienten diskutiert. Es wird jedoch kein Verfahren zur

Analyse und/oder Isolierung von Antigen-spezifischen T-Zellen offenbart oder nahegelegt. Solche Antigen-spezifischen T-Zellen sind durch eine auf ein definiertes Antigen oder ein definiertes Gemisch von Antigenen restringierte Reaktivität charakterisiert. In der Publikation von Berner et al. wird beispielsweise eine mögliche lange und erhöhte Expression des CD154 Moleküls auf vielen CD4+ Th-Zellen diskutiert (im Mittel ca. 45% in der RA CD40L<sup>high+</sup> Gruppe / Figure 1). Diese sind aber nicht durch eine restringierte Antigen-spezifität charakterisiert. Die Autoren selbst konstatieren, dass CD40L unter normalen Umständen „transient“ auf aktivierten T-Zellen detektierbar ist. Bereits seit 1998 ist die Expression von CD40L auf aktivierten T-Zellen von vielen anderen Gruppen beschrieben. Jedoch ist auch hinlänglich bekannt, dass das CD40L Molekül nach Aktivierung in vitro mit spezifischen Antigenen als Marker für spezifische CD4+ Th-Lymphozyten nicht mehr zur Verfügung steht.

Im weiteren wird im Stand der Technik, z.B. in der Publikation von Berner et al. die therapeutische Anwendung von anti-CD40L Antikörpern bei RA-Patienten beschrieben. Bei der „Antikörper-Therapie“ mit anti-CD154 Antikörpern geht man ausgehend von tierexperimentellen Systemen davon aus, dass durch die Gabe des anti-CD154 Antikörpers T-Zellinteraktionen mit B-Zellen (Unterdrückung von humoraler Immunität) und mit Antigen-präsentierenden Zellen (Unterdrückung von chronischer Entzündung) beeinflusst werden.

Bekannt sind im Stand der Technik verschiedene Aspekte der Biologie von CD154, wobei im Detail die Struktur, die

Regulierung der Expression, biologische Funktionen und medizinische Applikationen beschrieben ist (Schönbeck et al., 2000).

Schönbeck et al. offenbaren, dass die Expression von CD154 transient ist. Ferner werden verschiedene polyklonale Stimuli beschrieben, die eine CD154 Expression auf allen T-Zellen zu induzieren vermögen.

Weiterhin sind Studien bekannt, in denen immunomagnetische Reagenzien zur Isolierung von Monozyten, oder T-Zellsubpopulationeneingesetzt werden und nachfolgend isolierte Fraktionen solcher Zellen elektronenmikroskopisch untersucht werden (Fisher et al., 2002).

Die Signalübertragungswege des CD40 Moleküls in B-Lymphozyten sind teilweise gut analysiert. Auch Untersuchungen zur Dauer der CD154 Expression auf T-Zellen sind offenbart. Diese Daten wurden in experimentellen Systemen gewonnen, in denen aber keine Antigen-spezifischen T-Zellen in Zellgemischen nach spezifischer Aktivierung mit Antigenen oder Gemischen von Antigenen analysiert oder isoliert werden können. Fisher et al. beschreiben hingegen, dass die beobachtete CD154 Expression zum Teil transient ist und nur auf in vitro nach polyklonaler Stimulation generierten proinflammatorischen Th1-Zellen verlängert ist.

Im Stand der Technik sind demgemäß keine Methoden offenbart, Antigen-spezifische T-Zellen aufgrund ihrer Antigen-reaktiven CD154 Expression therapeutisch verwenden zu können.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher Verfahren bereitzustellen, mit denen alle Antigen-spezifischen T-Lymphozyten unabhängig von ihrem funktionalen Potential einfach, kostengünstig und sicher detektiert bzw. isoliert werden können.

Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem durch eine Verwendung von CD154 zum Nachweis und/oder zur Isolierung von T-Lymphozyten, die ein bestimmtes Antigen erkennen.

CD154 ist ein Mitglied der TNF-Gen-Familie und wird unter anderem von verschiedenen Zellen, insbesondere T-Lymphozyten exprimiert. CD154 wird ein bis drei Stunden nach der Aktivierung von den stimulierten T-Lymphozyten herunterreguliert.

Lymphozyten stellen die spezifischen Träger der Immunantwort dar, wobei zwei große Populationen bekannt sind: Die B- und die T-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten besitzen zahlreiche Oberflächenmoleküle, von denen das CD4- und das CD8-Protein von besonderer Bedeutung sind. Die CD4 T-Lymphozyten werden auch als Helfer-T-Zellen (Th-Zellen) bezeichnet, da sie über die Produktion löslicher Botenstoffe bei der Aktivierung anderer Zellen mithelfen.

Lymphozyten und andere Leukozyten exprimieren viele verschiedene Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Einige erscheinen nur kurzzeitig während bestimmter Phasen der Differenzierung oder nach Aktivierung des Zellen. Andere Moleküle sind konstant und typisch für die jeweilige Zellreihe. Solche konstant exprimierenden Antigene können als Marker für bestimmte Zellpopulationen genutzt werden.

Es gibt eine einheitliche Nomenklatur für Zelloberflächenmarker, das CD-System (CD = cluster of differentiation), in welchem die Marker fortlaufend nummeriert sind. So kommen beispielsweise auf NK- und T-Lymphozyten CD 154 wie auch CD 165 oder andere Moleküle vor.

Überraschend war, dass CD154 verwendet werden kann, um T-Lymphozyten unabhängig von ihrem funktionalen Potential nachzuweisen. Der überraschende Vorteil der Verwendung von CD154 zum Nachweis und zur Separation von T-Lymphozyten liegt darin, dass die T-Lymphozyten unabhängig von ihrer Funktion sicher detektiert bzw. isoliert werden können, d.h. alle Antigen-spezifischen T-Lymphozyten in einer Probe können bestimmt und separiert werden. Somit wird durch die erfindungsgemäße Verwendung vorteilhafterweise ein neuer praktikabler Kandidat für die Bestimmung von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten bereitgestellt.

Die offenbarte Lehre beinhaltet demgemäß auch die therapeutische Anwendung von Antigen-spezifischen T-Zellen nach Isolierung anhand ihrer nach in vitro Stimulation mit definierten Antigenen oder Antigen-Gemischen induzierbaren Antigen-reaktiven CD154 Expression.

Nach einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind die T-Lymphozyten Th-Lymphozyten, insbesondere CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup> Th-Lymphozyten. Für die Antigenerkennung benutzen T-Zell-Lymphozytenpopulationen eine T-Zellrezeptor (TZR), der ein heterodimeres Molekül darstellt, das aus verschiedenen Kettenkombinationen besteht. Der weitaus größte Teil aller T-Lymphozyten trägt einen alpha-/beta-T-

Zellrezeptor. Diese T-Lymphozyten besitzen weitere Oberflächenmoleküle, insbesondere das CD4- und das CD8-Protein. CD8-Lymphozyten werden von Antigenen stimuliert, die von Klasse-I-Molekülen des MHC präsentiert werden und sind als zytolytische T-Lymphozyten für die Virusabwehr von entscheidender Bedeutung. CD4-T-Lymphozyten erkennen Antigene, welche von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden und haben einen wesentlichen Anteil an der Abwehr von Bakterien, Pilzen, Protozoen und anderen Parasiten.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden inflammatorische, antiinflammatorische, regulatorische und/oder suppressive T-Lymphozyten nachgewiesen und/oder gewonnen.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Nachweis und/oder Isolierung von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten in einer Suspension nach Aktivierung mit einem Antigen, wobei die Suspension mit einem CD40/CD154-System-Inibotor in Kontakt gebracht wird, CD154 intra- oder und/oder extrazellulär bestimmt und die CD154 aufweisenden Zellen nachgewiesen und/oder isoliert werden.

Es ist überraschend, dass durch das „Inkontakt“-bringen der zu untersuchenden Suspension oder Probe mit einem CD40/CD154 System-Inhibitor CD154 intra- und/oder extrazellulär bestimmbar und somit die Zellen, die CD154 aufweisen, nachgewiesen und isoliert oder separiert werden können, wobei es sich bei diesen Zellen insbesondere um die Gesamtheit der Antigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> Th-Lymphozyten handelt.

CD40 ist ein 45-50 kDa großes membranständiges Glycoprotein aus der TNF-Rezeptor-Genfamilie (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Genfamilie). Es wird von verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen aber auch von Eptithel- und Endothelzellen, Karzinomen, Fibroblasten und Muskelzellen ausgeprägt. Es kann von CD154 gebunden werden, das dementsprechend Mitglied der TNF-Gen-Familie ist und ebenfalls von vielen Zellen mit sehr unterschiedlichen Funktionen exprimiert werden kann. CD40 wird auf verschiedenen Zellen exprimiert, wie zum Beispiel B-Lymphozyten, dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen, Mastzellen, hämatopoetische Stamm-/Vorläuferzellen (human), Thymusepithelzellen (Maus), Endothelzellen, Fibroblasten (Maus), Muskelzellen (human) und/oder Karzinome (human). CD154 wird beispielsweise auf T-Lymphozyten, aktivierte dendritischen Zellen (human), Monozyten, Mastzellen (human), basophilen/eosinophilen Granulozyten (human), NK-Lymphozyten (Maus), fetale Thymozyten (Maus) und/oder B-Zellen (human) exprimiert.

Entsprechend der sehr heterogenen Expressionsmuster auf verschiedenen Zelltypen sind zahlreiche CD40/CD154 Wechselwirkungen beschrieben. Das CD40/CD154 System ist ein Beispiel für verschiedene Systeme, die auf Rezeptor-Liganden-Interaktionen basieren und als solche eine große Bedeutung bei Reaktionen des Immunsystems haben. Die CD40/CD154-Interaktionen zwischen T-Lymphozyten und dendritischen Zellen (DC) sind u.a. von Bedeutung bei der Induktion und Regulation der Immunantwort von Bedeutung. Eine spezielle Stellung nehmen CD40/CD154 Interaktionen bei Entwicklung von humoralen Antikörperreaktionen ein. Eine besondere klinische Bedeutung zeigte sich bei dem

sogenannten X-chromosomalen Hyper-IgM-Syndröm; einer Immunerkrankung, bei der die Expression eines nicht-funktionellen CD154 zu einer stark verminderten Antikörperbildung und pyogenen Infektionen führt. In  
5 anderen Zellen beeinflusst die Signalweiterleitung über CD40/CD154 aber auch beispielsweise die Entstehung von Thromben in vivo und verstärkt die Entwicklung von Arteriosklerose.

Die Bedeutung des von T-Lymphozyten ausgeprägten CD154 ist  
10 somit vor allem während der Interaktion mit B-Lymphozyten für die Entwicklung von humoralen Antikörperantworten essentiell. Anscheinend kann das von T-Lymphozyten ausgeprägte CD154 auch mit von verschiedenen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiertem CD40 in  
15 Interaktion treten. Dies wird deutlich, da während der in vitro Stimulation mit spezifischen Antigenen CD154 auf aktivierte T-Lymphozyten sehr schnell herunter reguliert wird. Als für dieses Phänomen verantwortlich angesehen wird die Interaktion von CD154 auf den aktivierten T-Lymphozyten  
20 mit von in solchen Systemen auch von APC wie Monozyten stark exprimierten CD40. Die spezifisch von aktivierten T-Lymphozyten ausgeprägten CD154 Moleküle werden danach in den Zellen degradiert. Es steht dann in einem nicht durch das erfindungsgemäße Verfahren beeinflussten System als  
25 Marker für spezifische CD4+ Th-Lymphozyten nicht mehr zur Verfügung.

Durch die Zugabe eines CD40/CD154 System-Inhibitors wird die Wechsel- und Signalwirkung sowie Interaktion von CD40 und CD154 gestört bzw. inhibiert. CD40/CD154 System-  
30 Inhibitoren können im Sinne der Erfindung alle Moleküle



oder auch physikalische Einwirkungen sein, die in der Lage sind, die Interaktion zwischen CD40 und CD154 zu blockieren oder zu inhibieren. Demgemäss kann das inhibierende Mittel ein Antikörper, der beispielsweise gegen CD40 gerichtet ist, sein, ein Molekül, ein Cäsium- oder ein Lithiumion, welches die Wechselwirkung zwischen CD40 und CD154 untereinander beeinflusst. Es kann selbstverständlich aber auch eine Substanz sein, die die Sekretion oder Endozytose in der Zelle inhibiert, wie z.B. Brefeldin-A (Bref-A).  
10 Bref-A ist ein Inhibitor des Golgi-Apparates und der Sekretion einer Vielzahl an Zytokinen. Durch diese Stoffe wird gewährleistet, dass entweder CD40, CD154, die Wechselwirkung zwischen den beiden bzw. das CD40/CD154 System so modifiziert wird, dass CD154 entweder auf der  
15 Zelloberfläche nicht mehr herunter reguliert bzw. abgebaut wird, oder, sofern es sich noch innerhalb der Zelle befindet, nicht mehr innerhalb dieser transportiert wird. Durch die Unterbrechung des Transportes innerhalb der Zelle wird der Abbau von CD154 verhindert. Somit wird CD154  
20 innerhalb oder außerhalb der Zelle als außenstehender Rezeptor stabilisiert und kann mit dem Fachmann bekannten Nachweisverfahren detektiert und folgend isoliert werden. Dem Fachmann sind verschiedene Verfahren und Vorrichtungen bekannt, mit denen detektierte Zellen des Immunsystems  
25 separiert, aufgereinigt, angereichert bzw. isoliert werden können, z.B. die Durchflusszytometrie oder die magnetische Zellsortierung.

Durch die Zugabe des CD40/CD154 System-Inhibitors wird der Abbau oder die Degradation von CD154 innerhalb und/oder  
30 außerhalb der Zelle unterbunden, so dass die Zellen, die CD154 aufweisen, charakterisiert und folgend anhand dieser

Charakterisierung isoliert werden können. Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird somit insbesondere der neue erfindungsgemäße Kandidat, CD154, für die Bestimmung von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten bereitgestellt.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden als T-Lymphozyten Th-Lymphozyten detektiert und/oder separiert, insbesondere CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup> Th-Lymphozyten.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der CD40/CD154 System-Inhibitor ein gegen CD40 gerichteter  
10 Antikörper, ein gegen CD154 gerichteter Antikörper, ein Sekretionsinhibitor und/oder ein Endozytoseinhibitor. Dem Fachmann sind verschiedene Sekretionsinhibitoren und Edozytoseinhibitoren bekannt. Der Antikörper kann hierbei ein polyklonaler, monoklonaler bzw. ein spezifisch  
15 modifizierter Antikörper oder ein Antikörperfragment, beispielsweise ein Antikörper sein, der mit einem Phagen oder einem Phagenfragment assoziiert ist. Er kann sowohl gegen ein einzelnes Epitop auf CD40 bzw. gegen mehrere Strukturen von CD40 gerichtet sein. Ein Antikörper im Sinne  
20 der Erfindung ist ein Molekül, welches CD40 so beeinflusst, dass eine Wechselwirkung mit CD154 vorteilhafterweise nicht mehr möglich ist. Antikörper bedeutet daher im Zusammenhang mit der Erfindung ein Polypeptid, das im Wesentlichen von Immunoglobulin-Genen oder Fragmenten davon codiert wird,  
25 das CD40 spezifisch bindet bzw. erkennt. Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Begriff Epitop bedeutet eine beliebige Antigen-Determinante auf einem Antigen, an das das Paratop eines Antikörpers bindet. Epitop-Determinaten bestehen insbesondere aus chemisch aktiven  
30 Oberflächengruppierungen von Molekülen, wie Aminosäuren

oder Zuckerseitenketten und besitzen normalerweise sowohl spezifische Merkmale der dreidimensionalen Struktur als auch spezifische Ladungsmerkmale.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden  
5 als der Sekretionsinhibitor und/oder der Endozytoseinhibitor Brefeldin-A und/oder Monsensin verwendet. Brefeldin A ist ein Metabolit des Pilzes *Penicillium brefeldianum* und blockiert als carboxyliertes Ionophor den Transport neu synthetisierter Proteine vom  
10 endoplasmatischen Retikulum in den Golgi-Apparat und behindert den Austausch zwischen Endosomen und Lysomen während der Kreislauf zwischen Zellmembran und Endosomen vorteilhafterweise ungestört bleibt.

In einer weiteren, besonders bevorzugten Ausführungsform  
15 der Erfindung wird CD154 intrazellulär in fixierten Zellen detektiert. Da CD154 extrazellulär schnell herunterreguliert bzw. abgebaut wird, sobald eine Antigen-spezifische Aktivierung von insbesondere Th-Lymphozyten stattgefunden hat, kann CD154 mit Vorteil intrazellulär mit  
20 hoher Genauigkeit in-vitro detektiert werden. Insbesondere durch die Zugabe von Brefeldin A wird der Transport des Proteins CD154 an die Zelloberfläche blockiert. Vorteilhafterweise ist hierdurch die Analyse des gesamten CD154, welches sich intrazellulär befindet, auf sehr  
25 spezifische Weise möglich, was eine nahezu vollständige Detektion von insbesondere allen reaktiven CD4<sup>+</sup> Th-Lymphozyten ermöglicht. Durch die intrazelluläre Bestimmung von CD154 wird ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht, was eine sehr sichere und effiziente Bestimmung  
30 der Antigen-spezifischen Th-Lymphozyten ermöglicht.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden in inflammatorische, antinflammatorische, regulatorische und/oder suppressive T-Lymphozyten nachgewiesen und/oder isoliert und für zelluläre Therapien zur präventiven oder kausalen Behandlung von infektiösen, allergischen, inflammatorischen, malignen und/oder autoimmunen Erkrankungen eingesetzt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden inflammatorische, antiinflammatorische, regulatorische und/oder suppressive T-Lymphozyten nachgewiesen und/oder isoliert und für zelluläre Therapien zur präventiven oder kausalen Behandlung von Erkrankungen eingesetzt, wobei die Erkrankungen ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose, systemischen Lupus erythematosus, Sklerodermie, Vaskulitiden, reaktiver Arthritis, ankylosierender Spondylitis, Uveitis, Morbus Crohn und/oder Diabetes.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Detektion und zur Isolierung von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten, beispielsweise  $CD4^+$  Th-Lymphozyten, erlaubt es, insbesondere Antigen-spezifische Th-Lymphozyten für die Zelltherapie gegen verschiedene Krankheiten, wie beispielsweise Krebs oder virale Infektionen einzusetzen. Bisher wurden z.B. Th-Lymphozyten in Form von Zelllinien oder Zellklonen für die adoptive Th-Lymphozytentherapie verwandt. Die Herstellung dieser Zelllinien bzw. Zellklonen ist jedoch sehr aufwendig und benötigt einen langen Zeitraum. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es erstmalig, Antigen-spezifische Th-Lymphozyten mittels der Detektion von CD154 in kurzer Zeit in vivo wie in vitro zu

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird CD154 extrazellulär auf vitalen Zellen detektiert. Um insbesondere Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup> Th-Lymphozyten im therapeutischen oder klinischen Bereich einzusetzen, ist es erforderlich, die Zellen so zu detektieren, dass sie in ihrer Funktionalität nicht negativ beeinflusst werden, d.h., dass ein Nachweis vorteilhafterweise so gestaltet ist, dass die Zellen lebend und vital detektiert werden können, um sie folgend zur Herstellung eines Arzneimittels verwenden zu können. Es ist beispielsweise möglich, mittels anti-CD40-Antikörper CD40 zu neutralisieren, um den Abbau von CD154 auf der Zelloberfläche zu verhindern, was eine Detektion und Isolierung von Antigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup> Th-Lymphozyten erlaubt.

Es ist bevorzugt, die Antigen-spezifischen T-Lymphozyten, insbesondere CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup> aus Frischblut, gefrorenen Zellen, periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) und/oder aus anderen Körperflüssigkeiten zu gewinnen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die isolierten und/oder separierten T-Lymphozytenzellen, die keine Cytokine produzieren bzw. die kein definiertes Zytokinmuster aufweisen. Mit Vorteil ist es also möglich, alle Antigen-spezifischen T-Lymphozyten, d. h. die Gesamtheit dieser Zellpopulation, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet ist, zu detektieren und/oder zu isolieren, und zwar unabhängig davon, ob diese T-Lymphozyten Cytokine produzieren oder nicht oder ob die T-Lymphozyten sich keinen definiertem Zytokinmuster zuordnen lassen.

detektieren und zu isolieren. Somit ist es erstmals möglich, Th-Lymphozyten aufgrund ihrer Antigenreaktivität unabhängig von ihren Phänotyp zu selektieren.

Die erfindungsgemäße Lehre beschreibt analytische oder therapeutische Verfahren, deren Grundlage die CD154 Expression auf Antigen-spezifischen T-Zellen nach Stimulation in Gegenwart von einem CD154-CD40 Systeminhibitor ist. In der beanspruchten Lehre wird die Expression des CD154 nach Stimulation mit Antigenen oder Gemischen von Antigenen nicht polyklonal auf allen T-Zellen sondern selektive auf T-Zellen mit einheitlicher, definierter Antigenspezifität induziert. Systeme in denen polyklonal wie von Schönbeck et al. beschrieben mit Lektinen, Concanavalin A, Phorbolestern, Zytokinen oder verschiedenen Antikörpern stimuliert wird, erlauben die Aktivierung von T-Zellen in der Abwesenheit von Antigen-präsentierenden Zellen. Im erfindungsgemäßen Verfahren sind Antigen-präsentierende MHC-Moleküle exprimierende Zellen essentiell, um eine physiologische Stimulation ausschließlich der spezifischen T-Zellen zu induzieren. Das erfindungsgemäße Verfahren dient der Analyse und Isolierung Antigen-spezifischer T-Zellen, wobei die magnetische Zellsortierung eines der möglichen Verfahren ist, die detektierten Zellen des Immunsystems zu separieren, aufzureinigen, anzureichern bzw. zu isolieren.

Mit Vorteil ist es durch die Verwendung von CD154 als Marker für Antigen-spezifische T-Lymphozyten möglich, beispielsweise aus Körperflüssigkeiten oder künstlichen Zellsuspensionen gegen ein gewähltes Antigen oder gewählte Antigene spezifische T-Lymphozyten, insbesondere für

zelltherapeutische Anwendungen, zu gewinnen.  
Vorteilhafterweise ist es möglich, spezifische T-Lymphozyten zur Expansion oder mit nachfolgendem oder direktem adoptiven Transfer zu isolieren, wobei diese  
5 spezifischen T-Lymphozyten inflammatorische oder antiinflammatorische und insbesondere regulatorische oder suppressive T-Lymphozyten darstellen.

Im folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen veranschaulicht werden, ohne die Erfindung darauf zu  
10 beschränken.

#### Beispiel 1

Die Kinetik der intrazellulären CD154 Expression in Antigen-reaktiven Th-Zellen nach *in vitro* Stimulation von humanen Vollblut mit dem Superantigen Staphylococcus  
15 Enterotoxin B (SEB) wurde bestimmt. Jeweils 1ml Vollblut eines normalen gesunden Spenders wurde für die angegebenen Zeiten mit oder ohne SEB (1µg/ml) bei 37°C kultiviert. Für die letzten 2 Stunden der Kultur wurde der Sekretionsinhibitor BrefA zugegeben. Es sind auf CD4<sup>+</sup> Th-  
20 Zellen begrenzte Analysen gezeigt. In Fig. 1 ist die Kinetik der intrazellulären CD154 Expression gezeigt.

#### Beispiel 2

Fig. 2 zeigt den Nachweis Tetanus-Toxoid- (TT)-spezischer Th-Zellen und Allergen-spezifischer Th-Zellen in humanem  
25 Vollblut unabhängig von der Art der reaktiv produzierten Zytokine nach *in vitro* Stimulation mit TT und Allergen. Jeweils 1ml Vollblut gesunder Spender wurde mit oder ohne die angegebenen Antigene (TT: 10µg/ml / Allergen: 20µg/ml) für 6 Stunden bei 37°C kultiviert. Für die letzten 4

Stunden wurde der Sekretionsinhibitor BrefA zugegeben. Es sind auf CD4<sup>+</sup> Th-Zellen begrenzte Analysen gezeigt.

### Beispiel 3

Die Isolierung von lebenden Tetanus-Toxoid-(TT)-spezifischen Th-Zellen anhand der reaktiven CD154 Expression aus humanen peripheren mononukleären Zellen nach in vitro Stimulation mit TT ist in Fig. 3 dargestellt. Aus ca. 20ml Vollblut wurden periphere mononukleäre Zellen gewonnen. Diese wurden für 6 Stunden mit 10µg/ml TT in Gegenwart eines monoklonalen anti-CD40 Antikörpers bei 37°C kultiviert. Alle Proben wurden mit Antikörpern gegen CD4-FITC, CD69-APC und CD154-PE markiert. Zum Ausschluss von toten Zellen wurden Propidiumjodid verwendet. In 3A sind Analysen der CD154 Expression im Verhältnis zur Expression des Aktivierungsmarkers CD69 vor Isolierung gezeigt. Nach einer magnetischen Anreicherung mit PE-spezifische MicroBeads (3B) wurden lebende CD4<sup>+</sup>, CD154<sup>+</sup> Th-Zellen weiter mit dem FACS aufgereinigt (Figure 3C). In den Figuren 3A und 3B sind die Analysen auf CD4<sup>+</sup> Th-Zellen begrenzt.

Im folgenden sollen die potentiellen Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung anhand von weiteren Beispielen hervorgehoben werden, ohne die Erfindung auf diese zu beschränken.

### 25 Beispiel 4

Die Erfindung erlaubt ein „Screening“ nach T-Zellreaktivitäten mit Antigenen oder Antigenmischungen. Hierzu können Zellen in Körperflüssigkeiten entweder direkt



oder nach Aufarbeitung zu mononukleären Zellen mit den Antigenen oder Antigenmischungen für kurze Zeit in vitro unter geeigneten Bedingungen inkubiert werden, um dann nach Fixierung eine zytometrische Analyse der reaktiven Expression von CD154 vorzunehmen. Diese Vorgehensweise kann zum einen in Begleituntersuchungen bei Impfstudien Anwendung finden, oder auch in der Grundlagenforschung, um bisher nicht definierte immunrelevante Antigene zu definieren. Bei beiden Anwendungen ist es von großer Bedeutung, dass die Anwendung zum einen eine komplette Erfassung der spezifischen, Antigen-reaktiven T-Zellen erlaubt (insbesondere der CD4+ Th-Zellen) und zum anderen unabhängig von zuvor definierten immundominanten Peptid-Epitopen des Antigens oder im Vorfeld solcher Untersuchungen herzustellenden Probanden-spezifischen Reagenzien ist.

#### Beispiel 5

Die Anwendung erlaubt die Evaluation von Antigen-spezifischen T-Zellen mit den unterschiedlichsten Funktionen. Hierbei können es sich um inflammatorische T-Zellen, charakterisiert durch die reaktive Expression von z. B. IFNg, TNFa oder IL-2, antiinflammatorische T-Zellen, charakterisiert durch die reaktive Expression von z. B. IL-4, IL-5 oder IL-13, aber auch regulatorische T-Zellen handeln, die durch die Antigen-reaktive Expression von IL-10 oder TGFb charakterisiert sind. Ferner werden mit dem Verfahren auch T-Zellen erfasst, die sich nicht durch die Expression spezifischer Zytokine charakterisieren lassen. Somit kann das Verfahren neben Anwendungen in der

Grundlagenforschung einer kompletten Evaluation von Immunantworten in den verschiedensten klinischen Situationen leisten, wie bei Infektionen mit Viren, Bakterien oder anderen Pathogenen oder der Analyse von Immunantworten gegen Tumor- oder Leukämieantigene. Ferner können auch T-Zellen analysiert werden, die an allergischen Reaktionen beteiligt sind oder die in immunpathologischen Situationen wie GvHD oder GvL tragende Rollen spielen. Letztlich erlaubt das Verfahren erstmals die direkte Analyse von regulatorischen T-Zellen und insbesondere von sogenannten natürlichen T „regulatorischen“ Zellen, die bisher nur durch die Expression des Transkriptionsfaktors foxp3 und zum Teil durch die erhöhte Expression des CD25 Moleküls charakterisierbar waren.

15

### Beispiel 6

Die Anwendung erlaubt es ferner Antigen-spezifische T-Zellen für die weitere funktionale Untersuchungen und auch für klinische Anwendungen lebend zu isolieren. Zu den klinischen Anwendungen gehören unter anderem adoptive Therapien mit spezifischen T-Zellen zur kausalen spezifischen Therapie bei Infektionen mit Viren, Bakterien oder anderen Pathogenen, bei Tumor, Leukämie oder anderen malignen Erkrankungen, bei Allergien, Autoimmunerkrankungen oder anderen immun-vermittelten Erkrankungen wie z. B. GvHD oder GvL. Die Voraussetzung bietet sich hierzu, da die Anwendung eine Isolierung der Gesamtheit aller spezifischen T-Zellen gegen immunogene Peptide, Antigene oder Gemische von Antigenen erlaubt.

30

**Beispiel 7**

Die Anwendung erfüllt im Besonderen die Voraussetzung, dass Autoantigen-spezifische T-Zellen aus komplexen Zellgemischen zu isolieren. Solche Zellen könnten zum einen  
5 bei Patienten mit bereits „etablierten“ Autoimmunerkrankungen aus Körperflüssigkeiten wie z. B. peripherem Blut anhand ihrer reaktiven CD154 Expression nach in vitro Stimulation mit bei den jeweiligen Autoimmunerkrankungen relevanten Autoantigenen isoliert  
10 werden. Danach könnten die gewonnenen Zellen nach Expansion in die Patienten reinfundiert werden. So wäre erstmals eine spezifische Unterdrückung der Autoimmunreaktionen und damit eine kausale Therapie möglich. Zu den möglicherweise so therapierbaren Erkrankungen gehören unter anderem  
15 Krankheiten wie die rheumatoide Arthritis, die multiple Sklerose, der systemische Lupus erythematosus, die Sklerodermie, Vaskulitiden, reaktive Arthritis, ankolysierende Spondylitis, Uveitis, Morbus Crohn.

Die Anwendung kann auch zur prophylaktischen Therapie mit  
20 spezifischen regulatorischen T-Zellen von Patienten aus Risikogruppen bei Erkrankungen wie Diabetes oder den oben bereits genannten Autoimmunerkrankungen genutzt werden.

**Beispiel 8**

Die Anwendung erlaubt es ferner Antigen-spezifische T-  
25 Zellen auch in nicht-humanen Spezies zu analysieren bzw. für weitere Zwecke oder Untersuchungen solche spezifischen T-Zellen aus komplexen Zellgemischen zu isolieren. Sie ist somit nicht auf Erforschungen mit humanen Zellen beschränkt, sondern kann z. B. mit geeigneten Spezies-

spezifischen Reagenzien in Tiermodellen z. B. zur Erforschung von infektiösen Erkrankungen wie HIV in Affen eingesetzt werden. Weiter kann die Anwendung zur ex vivo Evaluation von definierten Immunantworten oder zur

5 Isolierung spezifischer T-Zellen in tierexperimentellen Systemen wie der Maus oder der Ratte eingesetzt werden.

**Patentansprüche**

1. Verwendung von CD154 zum Nachweis und/oder zur  
5 Isolierung von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten.
2. Verwendung nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
als T-Lymphozyten CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten  
10 nachgewiesen und/oder isoliert werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
inflammatorische, antinflammatorische, regulatorische  
15 und/oder suppressive T-Lymphozyten nachgewiesen  
und/oder isoliert werden.
4. Verfahren zum Nachweis und/oder Isolierung von  
Antigen-spezifischen T-Lymphozyten in einer Suspension  
20 nach Aktivierung mit einem Antigen, wobei die  
Suspension mit einem CD40/CD154 Systeminhibitor in  
Kontakt gebracht wird, CD154 intra- oder extrazellulär  
bestimmt und die CD154 aufweisenden Zellen detektiert  
und/oder separiert werden.
- 25 5. Verfahren nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
als T-Lymphozyten CD4<sup>+</sup> und/oder CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten  
nachgewiesen und/oder isoliert werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 oder 5,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
als CD40/CD154 Systeminhibitor ein anti-CD40-  
Antikörper, ein anti-CD154-Antikörper, CD40 oder CD154  
5 blockierende Substanzen, ein Sekretionsinhibitor  
und/oder Endozytoseinhibitor verwendet werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6,  
10 dadurch gekennzeichnet, dass  
als Sekretionsinhibitor und/oder Endozytoseinhibitor  
Brefeldin A und/oder Monsensin verwendet werden.
- 15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
CD154 intrazellulär oder extrazellulär in fixierten  
Zellen detektiert wird.
- 20 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 8,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
CD154 intrazellulär oder extrazellulär auf vitalen  
Zellen detektiert wird.
- 25 10. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 9,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
die T-Lymphozyten isoliert und/oder separiert werden,  
30 die kein definiertes Zytokinmuster aufweisen.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 10,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
inflammatorische, antinflammatorische, regulatorische  
und/oder suppressive T-Lymphozyten nachgewiesen  
5 und/oder isoliert werden und für zelluläre Therapien  
zur präventiven oder kausalen Behandlung von  
infektiösen, allergischen, inflammatorischen, malignen  
und/oder autoimmunen Erkrankungen eingesetzt werden.

10

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 11,  
dadurch gekennzeichnet, dass  
inflammatorische, antinflammatorische, regulatorische  
und/oder suppressive T-Lymphozyten nachgewiesen  
15 und/oder isoliert werden und für zelluläre Therapien  
zur präventiven oder kausalen Behandlung von  
Erkrankungen ausgewählt aus der Gruppe umfassend  
rheumatoide Arthritis, multiple Sklerose, systemischen  
Lupus erythematosus, Sklerodermie, Vaskulitiden,  
20 reaktive Arthritis, ankylosierende Spondylitis,  
Uveitis, Morbus Crohn und/oder Diabetes eingesetzt  
werden.

25

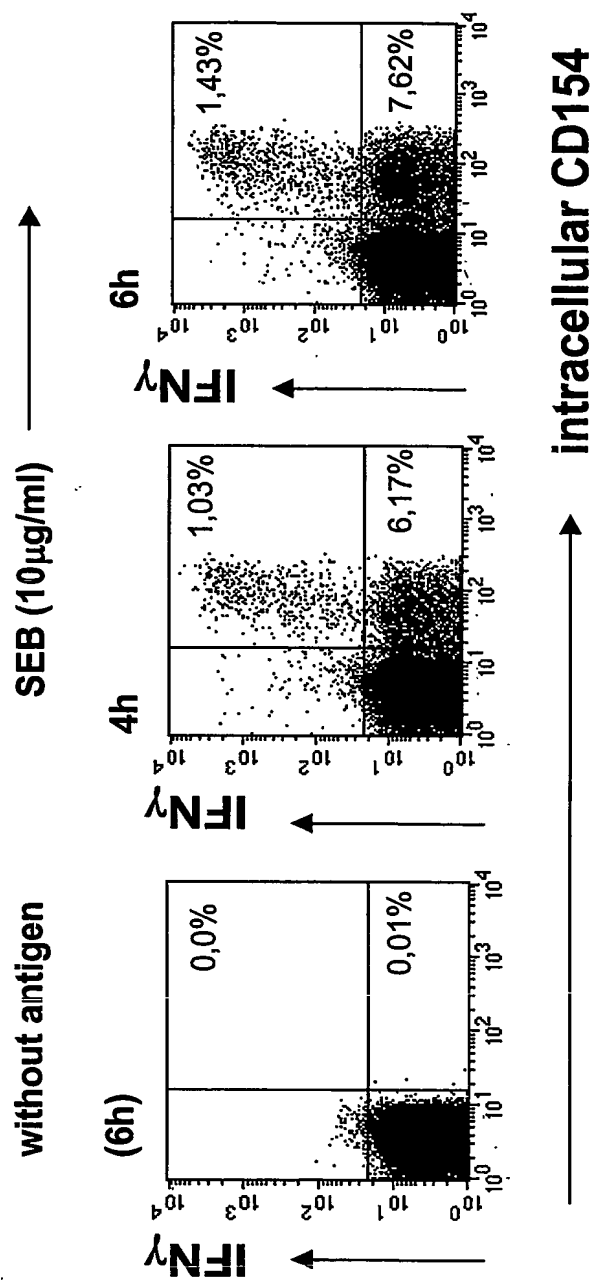


Figure 1



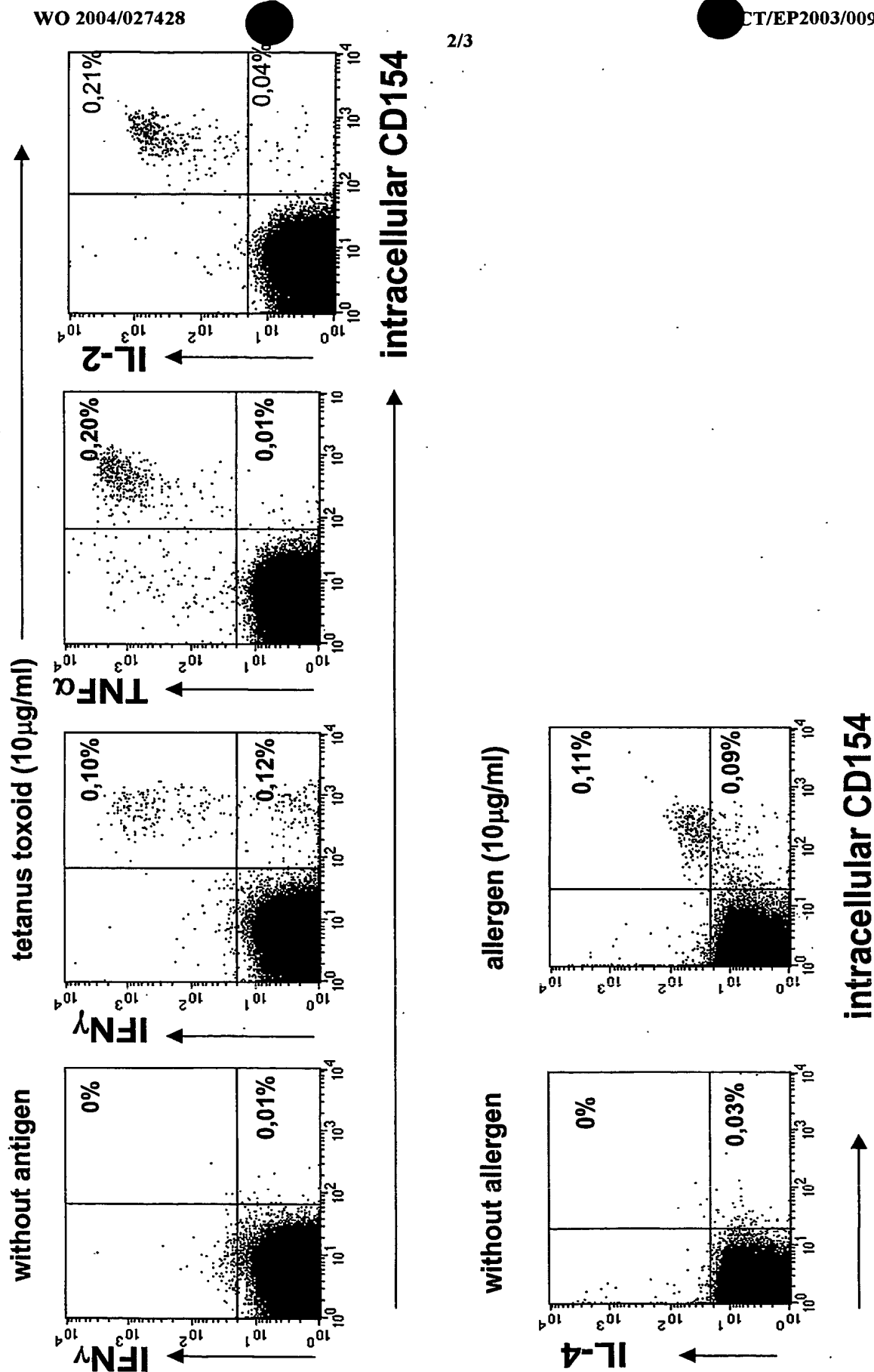


Figure 2

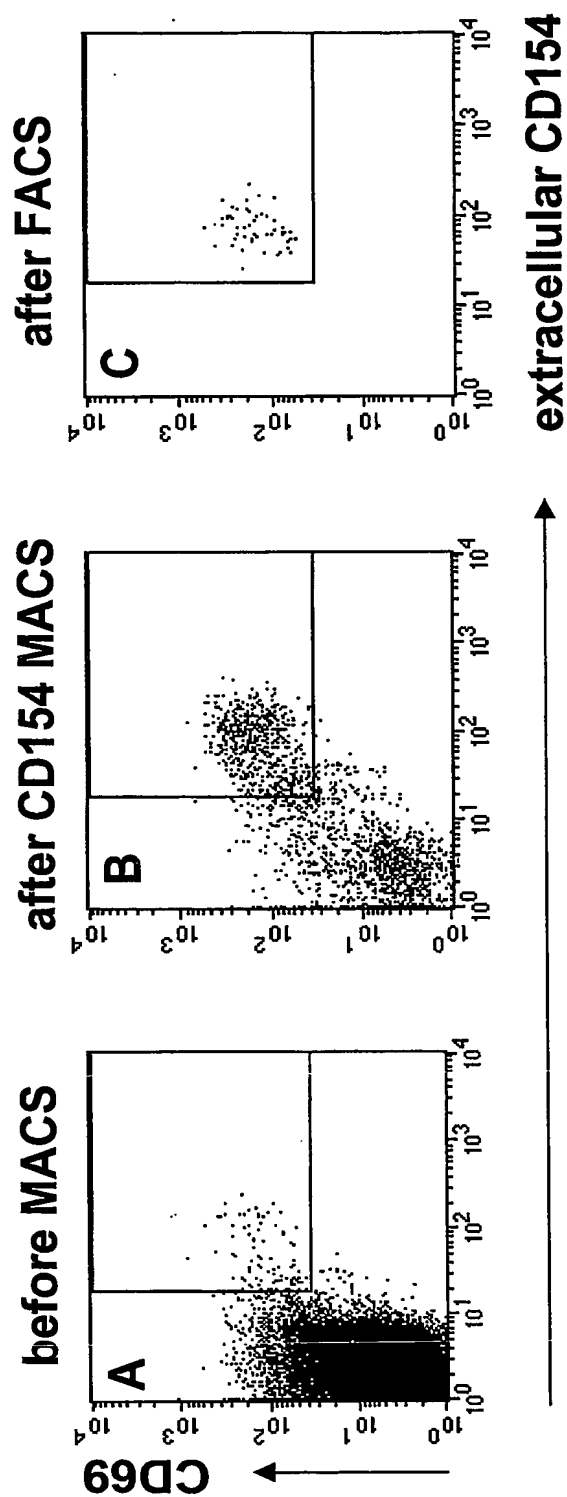


Figure 3

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/09354

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BERNER B ET AL: "INCREASED EXPRESSION OF CD40 LIGAND (CD154) ON CD4+ T CELLS AS A MARKER OF DISEASE ACTIVITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, GB, vol. 59, 2000, pages 190-195, XP002937171 ISSN: 0003-4967 the whole document	1-3
A	SCHOENBECK U ET AL: "CD154 (CD40 LIGAND)" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, EXETER, GB, vol. 32, no. 7, July 2000 (2000-07), pages 687-693, XP001053568 ISSN: 1357-2725 S. 690, Sp 1, Z. 17 - 33	1-10
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

21 January 2004

Date of mailing of the International search report

02/02/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hoese1, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/09354

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FISHER P J ET AL: "Immunomagnetic separation reagents as markers in electron microscopy" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 262, no. 1-2, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 95-101, XP004352178 ISSN: 0022-1759 S. 96, Sp. 2, Z. 31 - 33</p>	1-10
A	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 20 March 2002 (2002-03-20) LEE BYUNG O ET AL: "The biological outcome of CD40 signaling in B lymphocytes is dependent on the duration of CD154 expression on T cells: Reciprocal regulation by IL-4 and IL-12." Database accession no. PREV200200353975 XP002228655 abstract &amp; FASEB JOURNAL, vol. 16, no. 4, 20 March 2002 (2002-03-20), page A350 Annual Meeting of the Professional Research Scientists on Experimental Biology; New Orleans, Louisiana, USA; April 20-24, 2002, March 20, 2002 ISSN: 0892-6638</p>	1-10
X	<p>WO 99 58977 A (ASSENMACHER MARIO ;MILTENYI STEFAN (DE); SCHMITZ JURGEN (DE); MILT) 18 November 1999 (1999-11-18) page 40, line 5 -page 42, line 12; claims 51-55</p>	11,12
X	<p>VALMORI D ET AL: "ANTIGEN-TARGETED APPROACH TO ADOPTIVE TRANSFER THERAPY OF CANCER" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 59, no. 9, 1999, pages 2167-2173, XP000887155 ISSN: 0008-5472 abstract</p>	11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/09354

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
Although Claims 11 and 12 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the stated effects of the compound or composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/09354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9958977 A	18-11-1999	AU 765085 B2	11-09-2003
		AU 4073699 A	29-11-1999
		CA 2330678 A1	18-11-1999
		EP 1078263 A1	28-02-2001
		JP 2002514765 T	21-05-2002
		WO 9958977 A1	18-11-1999
		US 6576428 B1	10-06-2003

# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

International Patentzeichen

PCT/EP 03/09354

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/569

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BERNER B ET AL: "INCREASED EXPRESSION OF CD40 LIGAND (CD154) ON CD4+ T CELLS AS A MARKER OF DISEASE ACTIVITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS" ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES, BRITISH MEDICAL ASSOCIATION, LONDON, GB, Bd. 59, 2000, Seiten 190-195, XP002937171 ISSN: 0003-4967 das ganze Dokument	1-3
A	SCHOENBECK U ET AL: "CD154 (CD40 LIGAND)" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, EXETER, GB, Bd. 32, Nr. 7, Juli 2000 (2000-07), Seiten 687-693, XP001053568 ISSN: 1357-2725 S. 690, Sp 1, Z. 17 - 33	1-10
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. Januar 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02/02/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hoesel, H

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FISHER P J ET AL: "Immunomagnetic separation reagents as markers in electron microscopy" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 262, Nr. 1-2, 1. April 2002 (2002-04-01), Seiten 95-101, XP004352178 ISSN: 0022-1759 S. 96, Sp. 2, Z. 31 - 33 ---	1-10
A	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 20. März 2002 (2002-03-20) LEE BYUNG O ET AL: "The biological outcome of CD40 signaling in B lymphocytes is dependent on the duration of CD154 expression on T cells: Reciprocal regulation by IL-4 and IL-12." Database accession no. PREV200200353975 XP002228655 Zusammenfassung & FASEB JOURNAL, Bd. 16, Nr. 4, 20. März 2002 (2002-03-20), Seite A350 Annual Meeting of the Professional Research Scientists on Experimental Biology; New Orleans, Louisiana, USA; April 20-24, 2002, March 20, 2002 ISSN: 0892-6638 ---	1-10
X	WO 99 58977 A (ASSENMACHER MARIO ;MILTENYI STEFAN (DE); SCHMITZ JURGEN (DE); MILT) 18. November 1999 (1999-11-18) Seite 40, Zeile 5 -Seite 42, Zeile 12; Ansprüche 51-55 ---	11,12
X	VALMORI D ET AL: "ANTIGEN-TARGETED APPROACH TO ADOPTIVE TRANSFER THERAPY OF CANCER" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, Bd. 59, Nr. 9, 1999, Seiten 2167-2173, XP000887155 ISSN: 0008-5472 Zusammenfassung -----	11



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 03/09354

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Obwohl die Ansprüche 11 und 12 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Zeichen

PCT/EP 03/09354

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9958977 A	18-11-1999	AU 765085 B2	11-09-2003
		AU 4073699 A	29-11-1999
		CA 2330678 A1	18-11-1999
		EP 1078263 A1	28-02-2001
		JP 2002514765 T	21-05-2002
		WO 9958977 A1	18-11-1999
		US 6576428 B1	10-06-2003